






Techniques for preparing specimens for bacterial assays.**Publication number:** JP1503006T**Publication date:** 1989-10-12**Inventor:** KACIAN DANIEL LOUIS (US)**Applicant:** GEN PROBE INC (US)**Classification:**

- international: *G01N33/48; C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/24; C12Q1/44; C12Q1/68; G01N1/28; G01N1/36; G01N33/50; C12R1/32; G01N33/48; C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/24; C12Q1/44; C12Q1/68; G01N1/28; G01N1/36; G01N33/50; (IPC1-7): C12Q1/04; C12Q1/44; G01N1/28; G01N33/48*

- european: *C12Q1/24; C12Q1/68A4; C12Q1/68M10B; G01N33/50B; G01N33/50D6*

Application number: JP19880503551 19880330**Priority number(s):** US19870033435 19870401; US19880173612 19880325**Also published as:**

 EP0285439 (A2)
 WO8807539 (A1)
 US5364763 (A1)
 JP9168399 (A)
 EP0285439 (A3)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP1503006T

Abstract of corresponding document: **EP0285439**

Methods and compositions are disclosed for improved liquification of mucoid secretion specimens by treatment with disulfide bond reducing agents and/or DNA digestion agents, and for improved concentration of selected bacterial species from such specimens, by concentrating white blood cells in the specimen associated with the bacterial species. The procedures have applicability to bacterial assay techniques including nucleic acid hybridization, culture and stain techniques.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平1-503006

⑬ 公表 平成1年(1989)10月12日

⑭ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	
G 01 N 33/48		L-7055-2G	予備審査請求	未請求	部門(区分) 6(1)
C 12 Q 1/04		6807-4B			
	1/44	6807-4B			
G 01 N 1/28		J-7808-2G			(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 細菌検定用標本の調製技法

⑯ 特 願 昭63-503551

⑰ 翻訳文提出日 昭63(1988)12月1日

⑱ 出 願 昭63(1988)3月30日

⑲ 国際出願 PCT/US88/00959

⑳ 国際公開番号 WO88/07539

㉑ 国際公開日 昭63(1988)10月6日

優先権主張 ㉒ 1987年4月1日 ㉓ 米国(US) ㉔ 033,435
㉕ 1988年3月25日 ㉖ 米国(US) ㉗ 173,812

㉘ 発 明 者 カシイアン, ダニエル・ルイス アメリカ合衆国カリフォルニア92124、サン・ディエゴ、テンボ
ー・ロード3911番
㉙ 出 願 人 ジェン・ブローブ インコーポ
レイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア92121、サン・ディエゴ、キャンパ
ス・ポイント・ドライブ9880番
㉚ 代 理 人 弁理士 青 山 篠 外1名
㉛ 指 定 国 AU, JP, KR

請 求 の 範 囲

微生物を液状化する方法。

1. ムコイド性分泌物標本または他の粘性を有する生物学的標本を液状化するための方法であって、
(a) 該標本をジスルフィド結合還元剤と接触させて該標本中のタンパク分子内に於けるジスルフィド結合を開裂させる工程、および
(b) 該標本をDNA消化剤と接触させて該標本中のDNA分子内に於けるホスホジエステル結合を開裂させる工程からなることを特徴とする方法。
2. ジスルフィド結合還元剤がジチオトレイトールである請求項1に記載の方法。
3. DNA消化剤がデオキシリボスクレアゼ1である請求項1に記載の方法。
4. ムコイド性分泌物標本をジチオトレイトールおよびデオキシリボスクレアゼ1と接触させる工程を含む請求項1に記載の方法。

5. ムコイド性分泌物標本が喀痰標本である請求項1に記載の方法。
6. 喀痰標本を、ジチオトレイトールおよびデオキシリボスクレアゼ1からなる混合液と接触させる請求項1に記載の方法。
7. 選択された生物種の存在に関してムコイド性分泌物または他の粘性を有する生物学的標本を液状化するためのキットであって、該生物種を液状化する前に該標本を液状化する手段を有している該キットに於いて、該標本を液状化するための請求項1に記載の手段を該キット中に有するという改良。
8. 選択された細菌種の存在に関してムコイド性分泌物標本を液状化するためのキットであって、該細菌種を液状化する前に該標本を液状化する手段を有している該キットに於いて、該標本を液状化するための請求項1に記載の方法に係る手段を該キット中に有するという改良。
9. 選択された細菌種の存在に関して喀痰標本を液状化するための

ネットであって、該細菌を検定する前に該標本を液状化する手段を有している該ネットに於いて、該標本を液状化するための請求項 6 に記載の方法に係る手段を該ネット中に有するという改良。

10. 選択された細菌種がマイコプラズマまたは菌胆汁一耐性病原体である請求項 7 に記載の改良。

11. 選択された細菌種がマイコプラズマまたは菌胆汁一耐性病原体である請求項 8 に記載の改良。

12. 選択された細菌種がマイコプラズマまたは菌胆汁一耐性病原体である請求項 9 に記載の改良。

13. 選択された細菌種の存在に関してムコイド性分泌物または他の粘性を有する生物学的標本を検定するための方法であって、該細菌種を検定する前に該標本を液状化し、該液ハイブリダイゼーション技術によって該細菌種を検定する工程からなる該方法に於いて、該標本を、該標本中の DNA 分子に於けるホスホジエステル結合を開裂できる DNA 消化剤からなる消化混合物と接触させて該標本を液状化するという改良。

20. 選択された細菌種がマイコプラズマまたは菌胆汁一耐性病原体である請求項 17 に記載の改良。

21. 濃縮工程が遠心分離からなる請求項 17 に記載の改良。

22. 濃縮標本が実質的に細胞無傷の白血球細胞を含有する請求項 17 に記載の改良。

23. 選択された細菌種を生物学的標本から濃縮するための方法であって、

(a) 該選択された細菌種を隣接している白血球細胞を該生物学的標本から濃縮して濃縮標本を調製する工程、および

(b) 該濃縮標本中の該白血球細胞を、該細胞内で溶解して溶解された白血球細胞および該選択された細菌種の実質的に細胞無傷の細胞を含有する溶解濃縮標本を調製する工程からなることを特徴とする方法。

24. 生物学的標本がムコイド性分泌物標本を含有する請求項 23 に記載の方法。

25. 選択された細菌種がマイコプラズマまたは菌胆汁一耐

特許 1-563006 (2)

14. 消化混合物がさらに該本中に於けるジスルフィド結合を開裂できるジスルフィド結合還元剤を含有するという請求項 13 に記載の改良。

15. DNA 消化剤がデオキシリボヌクレアーゼである請求項 13 に記載の方法。

16. ジスルフィド結合還元剤がジチオトレイトールである請求項 14 に記載の方法。

17. 選択された細菌種の存在に関して生物学的標本を検定するための方法であって、選択された細菌種を該生物学的標本から濃縮して濃縮標本とし、該濃縮標本を該選択された細菌種に関して検定する工程からなる該方法に於いて、該生物学的標本から、該選択された生物種の一部を隣接している白血球細胞を濃縮することによって該濃縮標本を調製する工程を含む改良。

18. 生物学的種が粘液分泌物標本を含有する請求項 17 に記載の改良。

19. 粘液分泌物標本が唾液を含有する請求項 18 に記載の改良。

性病原体である請求項 28 に記載の方法。

26. 溶解試剤がデオキシコール酸の塩からなる請求項 23 に記載の方法。

27. DNA 消化剤を適用し、溶解濃縮標本を液状化する工程をさらに包含する請求項 23 に記載の方法。

28. DNA 消化剤がデオキシリボヌクレアーゼである請求項 27 に記載の方法。

29. 溶解試剤が、DNA 消化剤を不活化しない溶解試剤の中から選ばれる請求項 27 に記載の方法。

30. 溶解試剤がデオキシコール酸の塩からなる請求項 29 に記載の方法。

31. 液状化工程により、選択された細菌種の実質的に細胞無傷の細胞を含有する液状化された溶解濃縮標本を調製する請求項 27 に記載の方法。

32. 選択された細菌種の存在に関して生物学的標本を検定するための方法であって、選択された細菌種を該生物学的標本から濃

解して凍結標本とする手段を有する該キットに於いて、該凍結標本を調製する請求項17に記載の改良に係る手段を該キット内に有することを特徴とする改良。

32. 選択された細胞種の存在に関して生物学的標本を決定するためのキットであって、選択された細胞種を該生物学的標本から濃縮する手段を有する該キットに於いて、該細胞種を濃縮するための請求項23に記載の方法に係る手段を該キット内に有することを特徴とする改良。

34. 溶解凍結標本を液状化する手段をさらに包含するキットに於いて、溶解凍結標本を液状化する請求項27に記載の方法に係る手段をキット内に有することを特徴とする改良。

35. 選択された細胞種の存在に関してムコイド性分泌物標本または他の生物学的標本を決定するための方法であって、

(a) 請求項23に記載の方法によって、該選択された細胞種をムコイド性分泌物標本または他の生物学的標本から濃縮して凍結凍結標本を調製する工程、および

記載のキット。

43. ムコイド性分泌物標本が喀痰を含有する請求項42に記載の方法。

44. 生物学的標本がムコイド性分泌物標本である請求項36に記載のキット。

45. ムコイド性分泌物標本が喀痰を含有する請求項44に記載のキット。

特表平1-503006(3)

(b) 該選択された細胞種に関して該凍結凍結標本を決定する工程からなることを特徴とする方法。

36. 検定工程が、選択された細胞種を検出するのに適した核酸ハイブリダイゼーション工程であることを特徴とする請求項35に記載の方法。

37. 検定工程が、選択された細胞種を検出するのに適した培養工程であることを特徴とする請求項35に記載の方法。

38. 検定工程が、選択された細胞種を検出するのに適した染色工程であることを特徴とする請求項35に記載の方法。

39. 標本がムコイド性分泌物標本である請求項35に記載の方法。

40. 選択された細胞種がマイコプラズマまたは腸肝菌一門性病原体である請求項35に記載の方法。

41. ムコイド性分泌物標本が喀痰を含有する請求項39に記載の方法。

42. 生物学的標本がムコイド性分泌物標本である請求項33に

明 細 書

細菌検定用標本の調製技術

発明の背景

A. 関連出願

本出願は、1987年4月1日出願の米国特許出願番号07/033435の一般密続出願である。

B. 本発明および関連技術の分野

1950年代から1980年代初期にかけての研究者は、喀痰(sputum)などの各種のムコイド性分泌物の組成物質が供給源および特定の疾患過程の本質によって違いがあることを認識していた。具体的に言えば、ムコイドとして分類され、感染過程に関連していると通常知られているような炎症細胞が欠如している喀痰、および（炎症細胞として分類されるような）細胞を含有している喀痰が知られていた。タンパク質組成成分およびDNAは両者共に喀痰の粘性の一因であるらしいことが示され、これを支持する証拠が漸くめ

ていた。特に、DNAaseおよびプロテアーゼが喀痰および膿がある程度液化する能力のあることが確認された。DNAaseは、化膿性喀痰に併用すれば比較的高い活性を示すようであり、他方プロテアーゼは、ムコイド性喀痰に併用すれば比較的高い活性を示すようであった【リーバーマン(Lieberman), Amer. Rev. Resp. Disease, 97巻, 662-672頁(1968)]。

肺炎に加え、洗浄剤、塩素、酸化剤および漂白剤などの種々の物質が液化剤として試みられ、これらの中には、多少なりとも好適に作用するものがあった。これらすべての物質は、実際上は、実験の試験操作への使用および患者の消毒のための液化化など、1つまたはそれ以上の通常の目的にとっては、ある種の欠点を有していた。

1950年代の初め、スルフィドリル試剤であるN-アセチル-L-システインを使用すれば、その本質が化膿性かつムコイド性であるムコイド分泌物が劇的に液化化されることが報告された【ウェブ(Webb), J. Thoracic & Cardiovascular Surg., 44巻,

Naseの組合わせの有用性を研究することが阻止されたのかもしれない。

喀痰の流動性的性質を上記初期の研究者よりも、より定量的に測定しようとした最近の研究者の従来では、喀痰の粘性に対するDNAの作用が一般に引き抜かれて行われていた。彼らは、DNAの含有量と粘性との間に何等相関関係を見いだせなかった。即ち、彼らは、DNAに由来する粘性が、その物理学的状態およびその含有量によって左右されるものであることを完全に理解していなかったようである。大きい二重鎖DNAによって、短いあるいは1本鎖フラグメントに於ける溶液よりも粘性度の高い溶液となる。

このように、種々のムコイド性分泌物が種々の性質を有しており、これらの多様性が粘性タンパク質およびDNAが存在する相対的な量の相違に関連している可能性があるという初期の知見があったにも拘わらず、スルフィドリル試剤およびDNAaseを組合わせてムコイド性痰本の液化化を試みた報告をしている研究者はいなかった。

特表平1-503006(4)

380-343頁(1962)]。この試剤は、化膿性痰本の粘性に於ける重要な一因と仮定されていた粘線(ムコイド性痰本の粘性の殆どを支配していると考えられるタンパク質成分である)およびDNAの両者を液化化できると主張された。この試剤および関連化合物、ジチオトレイトール(米国特許第3,502,779号(1970年3月24日))によれば、従来の手段と比較し、多目的に、多くのムコイド性痰本が速くして液化化されると判断された。スルフィドリル試剤はDNA-タンパク複合体(核タンパク質ゲル)の分裂を助ける役目をするのかもしれないが、純粋なDNA溶液(これは非常に粘性があり得る)の粘性には作用しない。上記の初期の研究者の中には、これらの製剤中に混在しているDNAaseおよびプロテアーゼの作用を観察した者がいたのであろう。初期の研究者のうちに、プロテアーゼに対するDNAの阻害作用を認識していた者がいた。このように、スルフィドリル試剤で、タンパク質およびDNAに於ける粘性原因を破壊できたことを主張する主張がなされたので、これによって、他の研究者がスルフィドリル試剤およびD

細菌殺菌との関連性について、喀痰および他のムコイド痰または粘性生物学的痰本を液化化するのに使用された方法および構成は、各種の不利を伴っていた。希釈NaOHは痰本を液化化するが、ジチオトレイトール(DTT)よりも効能が弱く、さらにこれは多くの細胞を殺してしまい、また細菌性RNAを破壊してしまう(従って、このようなRNAは液状ハイブリダイゼーション検定を行うのに入手できない)。EDTAなどの金属キレート剤は、たいした成功を収めたわけではないが使用されていた。アスコルビン酸/硫酸銅/過硫酸ナトリウム混合物は、DTTに比べれば効能が少なく、また使用に際して危険性が伴う。ドデシル硫酸ナトリウムなどの洗剤は多くの細菌に対して毒性を示し、DTTよりも効能は少なく、染色法に於ける妨げとなる。次亜塩素酸ナトリウムも染色法に於ける妨げとなり、多くの細胞を殺してしまい、研究の対象とするには適分好ましくない。

喀痰および他のムコイド痰または粘性痰本の液化化に関連する問題に加え、このような痰本から細菌種を分離または検出することは、

ある特定の場合には菌類を包含している。特に、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属の細菌は、喀痰標本の密度が極めて水に近く、従って遠心分離が効率良く行えないので、喀痰標本から高濃度のいくつかの成分で分離することが困難である。

マイコバクテリウム属の感染症は、ヒトの致死率および罹患率に顕著に関与している。M. フベルグロシス(M. tuberculosis)は臨床的に最も悪影響のあるマイコバクテリウム病原菌である。1989年には、推定50,000人のアメリカ人が結核に罹った、という報告が23,846ケースあった。T9統計：州および市、罹患率および致死率の週報報告[States and Cities Morbidity and Mortality Weekly Report, 38巻, 62頁(1989)]。結核は、世界的にみれば年に約300万人が死亡する原因となっている[ヨーマンズ(Youmans, G. P.), フベルグロシス(Tuberculosis), 107頁, サウンダース(Saunders)(フィラデルフィア: 1979)]。2番目に最も臨床的に悪影響のあるマイコバクテリウム属の類は、M. アビウム(M. avium)およびM. イントラセルラレ(M. intracellulare)から構成される。アビウム・コンプレックスである

obacteria): 出典書籍 (Sourcebook), パートA (Kubica & Wayne (ワイネ)著), 138-175頁。マーセル・デッカー (Marcel Dekker), ニューヨーク: 1984)。

喀痰からマイコバクテリウムを分離するのに使用される技法にも、まず第1にD.T.Tで(液状化するまで)処理し、NaOHで処理し(非マイコバクテリウムを溶解させ、付随した白血球細胞からマイコバクテリウムを遊離させる)、次いで3800×gで約15分間遠心分離し、得られた残渣を中和することが包含される。ペレット化マイコバクテリウムを回収することは非能率的であり、またこの方法は、回収が定量的でない、理論的には感受性検定法に適さない。さらに、使用されるNaOH試薬は、マイコバクテリウムを標本中に非中位状態で長時間おき置くとマイコバクテリウムを殺してしまうかもしれない。クロロホルム抽出、凝結反応(アコハムレーション)、浮遊遠心分離法(flotation centrifugation)および水酸化アルミニウムまたは水酸化マグネシウムゲル中に於けるエントラップメント(entrapment)などの他の濃縮法は、極めて非能率的

猪表平1-503006(5)

colligata) から構成される。アビウム・コンプレックスである [グッド&ニードー(Good & Snider), J. Infect. Dis., 146巻, 829-833頁(1982)]。

マイコバクテリウム種を食出、分離および同定する伝統的な方法には、沈降性染色法、培養技法および生化学的な直接操作がある。マイコバクテリウムの存在法は、適当に染色処理した標本を顕微鏡学的に調査することで決定される。抗酸菌染色の存在は、マイコバクテリウムの存在を示している。マイコバクテリウムの初期検出を行った後、さらに標本を加工し、培養すればよい。2つの最も普遍に使用される培養技法は、ローウェンスタイン-ジェンセン(Lowenstein-Jensen)培養およびミドルブルック(Middlebrook)培養である。増殖させた後、分別検定を適用し、マイコバクテリウム属の存在に関して同定を行うことができる。疾病コントロールセンター(Center for Disease Control)は、マイコバクテリウム種を90%近く特異的に同定できる検定法の18シリーズを提供している [クービカ(Kubica, G. P.), ザ・マイコバクテリア(The Mycobacteria): 出典書籍 (Sourcebook), パートA (Kubica & Wayne (ワイネ)著), 138-175頁。マーセル・デッカー (Marcel Dekker), ニューヨーク: 1984)。

であるか、問題をはらんでおり、従って今日では広範に使用されてはいない [ミリス(Millis, H. S.)およびキューニングス(Cunning, M. M.)の「結核の診断および実験法(Diagnostic and Experimental Methods in Tuberculosis)」(1952)、スプリングフィールド(Springfield)、トーマス(G. C. Thomas.)の総説を参照]。マイコバクテリウムを遠心分離するためには、通常の遠心分離より高速超遠心分離が若干優れているが、これは高価であり、定量的な回収を行うことができない。

発明の要約

本発明は、特に、生物学的標本中の選択された細菌種の存在または不存在を検出するための検定法に関連するものであって、(1)ムコイド成分分泌物および他の粘性を有する生物学的標本を液状化すること、(2)マイコバクテリウムなどの細菌種を濃縮することに関する。

従って、本発明の第1の目的は、ムコイド成分分泌物および他の粘性を有する生物学的標本を、ジスルフィド結合還元剤およびDNA

消化剤からなる液状化用組合せ物を利用して液状化するための改良法および構成物を提供することにある。

本発明の第2の目的は、細胞種を生物学的標本（ムコイド性分泌物標本などの粘性を有する生物学的標本のみに限られない）から検出することに関する。この目的に趣かし、本発明は、標本中の白血球細胞に隣接した細菌を、無傷の白血球細胞を直接分離（例えば、遠心分離）することによって濃縮し、次いでこの白血球細胞を、柱目の細菌は實質的に細胞膜傷のままで残るように選択的に細胞溶解するという方法および手段を提供するものである。

本明細書によって開示している方法および構成物は広範囲の細菌検定法、例えば核酸ハイブリダイゼーション、培養および染色法に適用することができる。

詳細な説明

本発明は、ムコイド性分泌物標本または他の生物学的標本を選択された細菌種の存在に関して分析するのに有用な改良法および構成物に関する。詳細には、本発明は、例えば喀痰、肺野粘液、胃管内容物に関する。

を好適に分析するのに必要とされる他の要件にも適合している。多くの液状化法が従来使用されてきたが、本発明の方法と同程度に有効と思われる方法はない。

第2に、本発明は、選択細菌種の存在に関して分析することを目的とした、このような細菌種を分泌物標本または他の生物学的標本から濃縮するための改良法に関する。詳細に言えば、従来技術ではマイコバクテリウム属に属する細菌種のような上記の細菌種を濃縮または分離する上に於いて、大きな困難性を有しており、その理由は、通常の標本加工場地 (specimen processing media) 中にあるこのような細菌種が遠心分離などの常法を使用して分離に役立たないからである。本発明では、細菌を伴った白血球を好ましくは遠心分離で濃縮し、次いで細菌が實質的に細胞膜傷で残るように選択的に細胞溶解するものである。次に、このように濃縮された細菌、例えばマイコバクテリウムを、本発明の方法および構成物を用いて濃縮標本中で検定することができる。

本発明の方法および構成物は、試験染色法、培養法、生化学的

特表平1-503000(6)

粘液、腔液またはヒトもしくは他の動物から得られる他の粘液などのムコイド性分泌物標本が特定の細菌種に感染されていないかどうかを決定するための改良手段を開示するものである。本発明はさらに、他の生物学的試料、即ち尿、脳脊液、全血もしくは他の体液および分泌物にも適用することができる。

本発明は、このような検定を行う上で従来では内在していた多くの問題に関するものである。第1に、本発明は、粘液分泌物試料、例えば喀痰、他の粘性を有する生物学的試料を液状化できる改良手段を提供する。このような液状化は、選択された細菌種を効果的かつ正確に分析するためには必須である。この目的に本発明では、ジスルフィド結合還元剤およびDNA消化剤からなる液状化用組合せ物を使用する。好ましい還元剤はジチオトレイトールであり、他方好ましいDNA消化剤は、ウシの脾臓から精製されたデオキシリボスクレアーゼIである。これらの成分は、ムコイド性分泌物標本を液状化する上に於いて、漏れれて置かれた試料の代表であり、同様に、これらの組合せ物は、このような標本中の選択された細菌種

な濃縮操作、および特に核酸ハイブリダイゼーション法などの多くの細菌検定システムに使用するのに適している。本発明は喀痰試料中のマイコバクテリウムの存在に関して検定するのに特に適している。

本発明に於いて核酸ハイブリダイゼーション法は、3時間以内の標本の加工で、喀痰または他のムコイド性分泌物標本からマイコバクテリウムを直接同定するのに好適に使用される。核酸ハイブリダイゼーション検定は、短縮的な核酸の鎖が一筋になって二重鎖の複合体 (コンプレックス) を形成する能力に基づくものである。これに関しては概してミソソン&ダービー (Misson & Darby), 「ハイブリダイゼーション技術 (Hybridization Techniques)」, New Developments in Practical Virology, 185-229頁, Alan R. Liss, Inc. (ニューヨーク, 1982) を参照。このような検定は、ジェンプローブ インコーポレイテッド (Gen-Probe Inc.) [サン・ディエゴ, カリフォルニア] から入手できる。これらには、例えば細菌的微生物のリボゾームRNAに対して相補的な「+」探

酸化1本組DNAプローブを使用することができる【コーン(Cohne)らのレギオネラ(Legionella)に於けるProceedings of the 2nd International Symposium(トーンズベリー(Thornberry)編)107-108頁、American Society for Microbiology(ワシントン:1984)】。細胞溶解法を使用してリボソームRNAを微生物から遊離させた後、³²P-DNAプローブを標的微生物のリボソームRNAと結合させて安定なDNA:RNAハイブリッドを形成させる。得られた標識化DNA:RNAハイブリッドを、同相分離法を適用してハイブリダイズしたDNAプローブから分離する。回収された標識化DNA:RNAハイブリッドをガンマーカウンターで計数し、試験結果を、ネガティブコントロールの計数に対する患者の検本の計数の比率として計算する。

既述した検定法ではそれぞれ、出発物質である呼吸もしくは他のムコイド性分泌物標本、または他の粘性を有する生物学的標本の粘性を減低するために液状化工程を利用する。喀痰の粘性は、粘性糖タンパク質が凝縮することにその一因がある。さらに、化痰剤(肺

を好しく、ユナンスクレアーゼよりも有効な液状化物質である。

このような物質を組み合わせることにより、従来行われていた、あるいは当業界既知の方法および構成よりも優っている液状化の成績が得られることが発見された。DNA還元剤は、例えば粘性糖タンパク質に於いてタンパク鎖(proteinaceous chains)を破壊しているジスルフィド結合を開裂し、他方、DNAase酵素は、例えば化痰性喀痰標本中に存在するDNA分子を分解するので、上記これらの物質は、組み合わせれば役立つようである。

喀痰または他のムコイド性分泌物の由発標本は、既述の還元剤およびDNA消化剤を連続して、あるいは同時に暴露させて液状化することができる。典型的な技法としては、D₁Tの0.9%滅菌生理食塩水0.01M溶液1mlを、等量の喀痰試料に加える。次いで、その試料が液状化するまで(通常は1分よりも短い)、試料を攪回(vortex)する。次いで、得られた試料を室温(18-25℃)で5分間インキュベートし、もう1度手短かに攪回する。次いで、60μl容量の円錐形遠心管に於いて、可消化した喀痰(2μl)をD

特表平1-503006(7)

製した)喀痰または他の生物学的試料は、破壊された細胞(例えば、マイコバクテリウム)および死亡した白血球細胞(主としてマクロファージおよび顆粒球)に由来する宿主の防御反応の結果として発生した粘性DNAを多量に含有しているからしれない。

本発明は、ジスルフィド(システイン)結合還元剤およびDNAaseなどのDNA消化剤の混合物を利用して、出発物質喀痰試料または他の粘性もしくはムコイド性生物学的試料の液状化を図るものである。これらの試料は、試料に由来するジスルフィド結合およびホスホジエステル結合の開裂作用程度が、組合わせて満足いく液状化レベルに達するのに十分であるように、選択および適用すべきである。具体的には、非常に好ましいジスルフィド結合還元剤はジチオトレイトール(DTT)であり、他方非常に好ましいDTT消化剤は、ウシ肝臓から精製されたデオキシリボヌクレアーゼ(DNAase1)である。他の有用なジスルフィド結合還元剤としては、N-アセチルシステイン、システインおよび2-メルカプトエタノール、スルホナートを挙げることができる。ユンドスクレアーゼは一般に

T₁の0.9%滅菌生理食塩水約0.1M溶液約1mlと一協にする。

次いで、この混合物に、0.85%(w/v)NaCl、5mM MgCl₂、5mM CaCl₂(0.02%フ化ナトリウム保存液)中の濃度約7500コロニー/μlのDNAase1(ウシ肝臓から精製、シグマ・ケミカル Co.(Sigma Chemical Co.)またはターバー・バイオメディカルズ(Cooper Biomedical)、約1000-2000コロニー/μg)を4μl加える。この混合物を手短かに攪回し、室温で5分間インキュベートする。次に、この円錐形遠心管に、混合しながら、0.9%滅菌生理食塩水約30μlを加え、試料を、逆高バケットローターで5分間1900-2100rpmにて遠心分離する。

DNAase溶液は、好ましくは、DNAaseの酵素活性の活性化、保存中の酵素の安定化(Ca⁺⁺)および遠心分離中に於ける喀痰試料中の白血球細胞の細胞壁の安定化に役立つマグネシウム(Mg⁺⁺)およびカルシウム(Ca⁺⁺)の供給源を含有させる。本発明の1つの重要な側面は、細菌の溶解液中、標本中の白血球細胞(粘膜炎喀痰の場合には主としてマクロファージ)が細菌感染の状態で保持

膜化1本組DNAプローブを使用することができる【コーン(Cohn)らのレギオネラ(Legionella)に於けるProceedings of the 1st International Symposium(トーンズベリー(Torresberry)編)107-1108頁、American Society for Microbiology(ワシントン:1984)】。細胞溶解技術を使用してリボゾームRNAを微生物から遊離させた後、 ^{16}S -DNAプローブを病的微生物のリボゾームRNAと結合させて安定なDNA:RNAハイブリッドを形成させる。得られた標識化DNA:RNAハイブリッドを、同様に分離標識も使用してハイブリダイズしたDNAプローブから分離する。吸収された標識化DNA:RNAハイブリッドをガンマカウンターで計数し、試験結果を、ネガティブコントロールの計数に対する患者の試本の計数の比率として計算する。

前述した検定法ではそれぞれ、出発物質である喀痰もしくは他のムコイド分泌物試本、または他の粘性を有する生物学的試本の粘性を減じるために液状化工程を適用する。喀痰の粘性は、粘性性タンパク質が存在することにその一面がある。さらに、化膿性(所

好ましく、ユキソスクレアーゼよりも有効な液状化物質である。

このような物質を組み合わせることにより、従来行われていた、あるいは当業界既知の方法および構成よりも優っている液状化の成績が得られることが発見された。DNA還元剤は、例えば粘性性タンパク質に於いてタンパク鎖(proteinaceous chains)を破壊しているジスルフィド結合を開裂し、他方、DNAase酵素は、例えば化膿性喀痰試本中に存在するDNA分子を分解するので、上記これらの物質は、組み合わせれば役立つのである。

喀痰または他のムコイド分泌物の出発試本は、既述の還元剤およびDNA消化剤を連続して、あるいは同時に暴露させて液状化することができる。典型的な技法としては、DTSの0.9%濃度生理食塩水0.01M溶液1mlを、等量の喀痰試本に加える。次いで、その試料が液状化するまで(通常は1分よりも短い)、試料を旋回(vortex)する。次いで、得られた試料を空室(18-25℃)で5分間インキュベートし、もう1度手短かに旋回する。次いで、60μl等量の円錐形濾心室中に於いて、可溶化した喀痰(2μl)をD

特表平1-503006(7)

製した)喀痰または他の生物学的試料は、破壊された喀痰(例えば、マイコバクテリウム)および死亡した白血球細胞(主としてマクロファージおよび顆粒球)に由来する宿主の防御反応の結果として発生した粘性DNAを多量に含有しているからしれない。

本発明は、ジスルフィド(システイン)結合還元剤およびDNAaseなどのDNA消化剤の混合物を利用して、出発物質喀痰試料または他の粘性もしくはムコイド生物学的試料の液状化を図るものである。これらの試料は、試料に由来するジスルフィド結合およびホスホジエステル結合の開裂作用程度が、組合わせて満足のいく液状化レベルに達するのに十分であるように、選択および適用すべきである。具体的には、非常に好ましいジスルフィド結合還元剤はジチオトレイトール(DTT)であり、他方非常に好ましいDTT清化剤は、ウシ脳臓から精製されたデオキシリボスクレアーゼ(DNAse1)である。他の有用なジスルフィド結合還元剤としては、N-アセチル-L-システイン、システインおよび2-メルカプトエタノール、スルホネートを挙げることができる。ユンドスクレアーゼは一般に

DTTの0.9%濃度生理食塩水約0.1M溶液約1mlと一緒にする。次いで、この混合物に、0.85%(w/v)NaCl、5mM MgCl₂、5mM CaCl₂(0.02%フジ化ナトリウム保存液)中の濃度約7500+ロユニット/mlのDNAse1(ウシ脳臓から精製、シグマ・ケミカル Co. (Sigma Chemical Co.)またはコーバー・バイオメディカルズ(Cooper Biomedicals)、約1000-2000+ロユニット/μg)を4μl加える。この混合物を平均に旋回し、室温で5分間インキュベートする。次に、この円錐形濾心室に、混合しながら0.9%濃度生理食塩水約30μlを加え、試料を、環状ペトリプレートで5分間1900-2100×gにて遠心分離する。

DNAse溶液は、好ましくは、DNAaseの酵素活性の活性化、保存中の酵素の安定化(Ca⁺⁺)および遠心分離中に於ける喀痰試料中の白血球細胞の細胞壁の安定化に役立つマグネシウム(Mg⁺⁺)およびカルシウム(Ca⁺⁺)の供給源を含有させる。本発明の1つの重要な側面は、初期の濃縮操作中、試本中の白血球細胞(粘性性喀痰の場合には主としてマクロファージ)が細胞膜の状態で保持

まれるならば、培養試料からマイコプラズマを濃縮（即ち、分離または単離）して濃縮標本にすることのできる能力は、極めて高められるという発見である。この发现は、このような白血球細胞が免疫応答中に、例えばマイコプラズマのような細胞内細菌を高程度に増殖するという事実に基づくものである。このような増殖性は、細菌が白血球細胞の内部に侵入する性質、または細菌に対する白血球細胞の表面粘着の性質によるものであるかもしれない。本発明は、この増殖性を利用し、容易に到達できる細胞内細菌の過剰の過心法を利用して場所的細菌の濃縮および増殖を改良したものである。

この意義のある発見に照らせば、出発培養試料を液状化するのに使用される液状化剤には、粘性多糖タンパク質およびDNA成分を数早くかつ完全に消化できると共に、同時に標本中に残存している白血球細胞の細胞的完全性を実質的に分解しないような構成物を選択しなければならないことは明らかである。喀痰または他のムコイド性分泌物標本の消化（液状化）を助けると共に、同時に白血球細胞の安定性を高めるMg⁺⁺またはCa⁺⁺のような成分が望ましいことも

め液状化剤）の組合わせ物は、同時に良好な液状化の成績を収めることに加え、検定全体として実施する本発明に注意して適合させることに配慮する。クンザルから精製されたDNAse Iは、細胞溶解試料（特に、デオキシコール酸ナトリウム(sodium deoxycholate)）の存在下でもその活性を保持できるDNA消化剤の1つの例であり、従ってこのDNA消化剤は本発明を実施する上で好ましいものである。

本発明の使用に適した液状化剤に伴う機能的要件は、白血球細胞の液状化および過心分離の後に続く反応工程に関連している。解離の白血球細胞および随伴細菌を含有している、過心分離によって得られるペレットは得られた上清をデカントすることによって単離される。この上清は消化された、あるいは死亡した白血球細胞および細菌、過剰のD⁺TおよびDNAse、ならびにムコイド性分泌物標本の消化液状化の後に残った糖タンパク質およびDNAを含有しているかもしれない。次に、この時点で、細菌を、例えば白血球細胞の溶解によって残留の白血球細胞から分離する。細胞を溶解する

明らかである。

さらに、本明細書で既述したような標本消化剤に於ける、注意して選択した組合わせ物を使用することは、好成績を収める検定の計画全体にとって非常に便利であるという後記の考察も理解できるであろう。詳細には、核酸ハイブリダイゼーション法の検定法に関連してDNAseまたは他のヌクレアーゼを使用することは、このような酵素がこの検定法の後期に使用されるハイブリダイゼーションプローブおよび/または細菌性標本の消化するであろう事実が設定される通常の条件下では、不便であるとうなせるであろう。しかしながら、本発明はこの問題を回避しており、後期の加工段階で特異的に不活化されるある種のDNAseを利用することによって、DNAse消化剤を高い有用性で使用することができる。しかし、同等に重要な事実、本発明で使用するDNAseは他の物質、例えば細胞溶解剤が存在していたとしてもDNAseの活性を保持しており、本発明を実施する上に於いてもこれを使用していることである。従って、本明細書に於いて特許請求している液状化剤（標本の消化のた

めの多くの方法は当業界周知であるが、本発明を最も好適に実施するためには、白血球細胞を溶解することができ、随伴細菌を遊離すると同時にその遊離細菌を細菌の細胞として保存できる溶解試料を利用する。さらに、細胞溶解剤、濃縮された標本に後期に加えられ、白血球細胞（または、もし存在するならば他の溶解細胞）から遊離されたDNA物質を消化するDNAseの内、少なくとも1つのDNAseの活性を阻害しない溶解試料を使用することが最も好適である。

培養板、染色法または核酸ハイブリダイゼーション法によって検定されるべき、選択された菌種の場合は、白血球細胞を溶解した後でも、選択細菌種を細胞無傷の形態で保持させることが必須であろう。例えば、培養法では、後の増殖のために生存細胞が必要であり、染色法では主として、少なくとも細胞増殖の検出が必要である。核酸ハイブリダイゼーション検定に於ける細菌の検定工程は選択細菌種の溶解を伴うものであるが、それでも、増殖を早まった細胞溶解は、細胞中の標的RNAまたはDNAを、濃縮された標本中に存

にしているかもしれないRNAaseおよびDNAaseに暴露してしまうので、最終的なハイブリダイゼーション検定工程の前までは細胞を細胞無傷の状態で保持することが都合よい。例えば、このようなヌクレアーゼは、培養した白血球細胞、ペレット中に溶解された他の細胞、または上清を遠心分離し、デカントした後には濃縮液中に残っている喀痰から由来し得る。さらに、白血球細胞または他の溶解微生物から遊離されたDNAを消化させるために、付加的なDNAaseを溶解した白血球細胞の濃縮液本に加えることが好ましいが、しかし、このようなDNAaseは、検定のために選択された細菌種がペレット化白血球細胞の濃縮液本を溶解した後で細胞無傷でない場合には、これらの細菌種のDNAを攻撃する可能性がある。これらすべての理由から、検定のために選択された細菌種を細胞無傷のままですべてでなく方法によって白血球細胞を溶解することが好ましい。

マイコバクテリウムの場合、溶解試剤であるデオキシコール酸ナトリウムは、濃縮液中で、マイコバクテリウムで付随した白血球細胞を溶解することができ、その間、濃縮液中に存在するRNA

である。例えば、培養検定は一般に、検定に対して選択された細菌が培養生存の程度まで細胞無傷であることが必要であろうし、一方、核酸ハイブリダイゼーション検定は一般に、細胞中の標的RNAまたはDNAが、例えば濃縮液中に残ったRNAaseまたはDNAaseの攻撃から保護される程度にまで細菌が細胞無傷であることが必要であろう。「細胞無傷」に於ける他の定義は、他の検定方法によって適切であるかもしれない。従って、上記に加え、白血球細胞が濃縮工程の間に有用なレベルの標的細菌への付随性を保持できるならば、その白血球細胞は、既述した液状化および濃縮の後に細胞無傷であるとなすことができる。

ペレット化した無傷の白血球細胞の濃縮液本を溶解すれば、DNAなどの遊離された細胞内成分は通常、濃縮液本を、その後の検定の簡便な加工にとっては粘性の堅すぎる形態にするものである。従って、溶解白血球細胞の濃縮液本にDNAaseまたは濃縮液中で白血球細胞もしくは他の溶解細胞から遊離された核酸物質も消化である他の酵素を加えると有用である。白血球細胞を溶解するのに使用さ

特表平1-50300(9)

seまたは他の成分によるマイコバクテリウムのRNAの破壊に抵抗してマイコバクテリウムを細胞無傷のままに保持することのできることを発見された。マイコバクテリウムはデオキシコール酸ナトリウムに対しても、白血球細胞がこの溶解剤で溶解された後にマイコバクテリウムが培養物中の生存性を保持する程度まで細胞無傷であると考えられる。サルモネラ(Salmonella)およびシゲラ(Shigella)などの腸型一菌性の病原体のような他の細菌も、付随白血球細胞のデオキシコール酸ナトリウムによる細胞溶解に対して細胞無傷のままであろう細菌種の例である。

デオキシコール酸の他の菌も、その他の溶解剤がよいように、選択的溶解を行う上で好適であり得る。既述の選択的溶解を行うのに好適なあらゆる溶解試剤、即ち、細胞無傷の形態である注目菌の選択された細菌種を遊離する態様で濃縮白血球細胞を溶解することが本発明の範囲内に限されることは定評できるであろう。本明細書に於いては、細菌が特定の検定方法によって検定することができる物理的形態で保持されているならば、その検定方法に関して「細胞無傷」

れる溶解試剤は、少なくとも1つのDNAaseまたはこの後期の溶解消化工程に進んだ後の酵素の活性を阻害しない物質であるべきである。デオキシコール酸ナトリウムがこの場合も適当な溶解試剤である。これとは対照的に、溶解試剤アデニル硫酸ナトリウムはDNAaseおよびRNAaseの発酵を不活化するものであり、従ってヌクレアーゼを使用してその後の消化を行う場合には白血球細胞の濃縮液本を溶解するには好ましくない溶解試剤の例である。

本発明に係る後期の溶解性DNA消化工程はウシ肝臓から精製したDNAaseIを使用して行えば、液状化され、かつ溶解された濃縮液本を得ることができる。このDNAaseは出芽ムコ多糖分泌物質本の発酵の液状化で利用したものと同じであり、本発明を実施する上では好ましいものである。他のDNAaseも利用することができ、これらも本発明の範囲内に限される。既述したように、このような消化剤は、白血球細胞の濃縮液本を溶解するのに使用される溶解試剤に対して安定であるべきである。細胞的DNAから構成されるプローブを加えるべき核酸ハイブリダイゼーション検定に於ける例の

ように、消化剤の選択に当たっては、DNAseまたは他の核酸溶解性消化剤を不活化するその他の加工工程に於いて都合の悪いと懸われる程度までの消化剤を選択するという事実に留意すべきである。ウシ胚胎由来のDNAse I はこれらの要件を満たすものである。注目の細菌種（このようなものが標本中に存在していれば）を付随したペレット化した無傷の白血球細胞を含有する凍結標本の溶解は、上清をデカントした後に行う。溶解試剤の過量、即ちデオキシコール酸ナトリウム（水中、16%）の場合には出芽環状試料1μgに対して約2滴（約0.04μl）を白血球細胞ペレットに加える。次いで、このペレットを、発泡ミキサーを使用して懸濁し、室温で5分間インキュベートする。

この溶解工程の後、DNAseなどのDNA消化剤を凍結標本に加える。ウシ胚胎DNAse I 7446キロムット/μlを含有する溶液の場合、1滴（約0.04μl）には、溶解工程に於いて白血球細胞から遊離されたDNAを消化し、適宜に不活化するのに十分な酵素が含まれている。この消化混合物を約20-25℃で約5分間

に十分な細胞無傷の状態を保持できない場合もある。このような場合には、本発明の技術は、ある種の修飾工程を行うことで依然として好適に実施することができる。

第1に、広い範囲の細菌種に適用できる一般的な技法である、細胞を付随した白血球細胞の溶解方法によって、決定されるべき選択細菌種を培養試料から濃縮する。この技法は、例えば、以後の加工工程で遭遇するかもしれない細胞の完全性の問題はあっても、最初の濃縮工程として利用することができる。

核酸ハイブリダイゼーション検定の場合は、決定されるべき細菌種の核酸成分を、核酸を分解し得るDNAseまたはRNAseなどの物質に懸濁することから避けることが望ましい。注目の細菌種を、白血球細胞の溶解に際して細胞無傷の状態に保持できない場合には、溶解した凍結標本中に存在しているかもしれないDNAseまたはRNAseを同時に不活化する溶解工程を直接行うことが望ましいであろう。例えば、ペレット化した白血球細胞を、DNAseおよびRNAseを同系または変性するイデシル硫酸ナトリウムで溶解し、次い

特表平1-503006 (10)

インキュベートすれば、以後の検定工程にとって十分に液状化された濃縮標本が得られる。溶解し、消化したばかりのこの濃縮標本を直ぐに選択された細菌種の存在に際して試験しない場合、例えばマイコバクテリウムのような場合には、約2-8℃で24時間保存することができる場合がある。

マイコバクテリウム属の細菌は、細胞壁に高含量のろう様脂質物質（very lipid materials）を有していることが一因となって、自身の細胞の完全性が破壊されることは対しては比較的抵抗力がある。このような細菌は、核酸ハイブリダイゼーション検定を目的としたデオキシコール酸ナトリウムおよびイデシル硫酸ナトリウムなどの溶解試剤に対して細胞無傷の状態で保持している。適心分離で濃縮された標本中の白血球細胞を溶解することである溶解剤に対して安定である他の細菌種も、上述の濃縮、溶解および消化工程にしたがって処理することができる。要約したように、病原性細菌の病原体はこのカテゴリー内に包含することができる。しかし、他方、決定に際して選択された細菌種が、例えば白血球細胞の溶解工程の間

で遊離された核酸（正としてDNA）を閉鎖でき、溶解した濃縮標本の粘度を小さくすることのできる溶液処理工程を行えばよい。別法としては、一度にDNAseまたはRNAseを不活化しないデオキシコール酸ナトリウムなどの溶解剤を、RNAse阻害物質および付加DNAseと共に使用すればよい。この組合わせによれば、溶解白血球細胞および細胞から遊離されたDNAが消化され、従って濃縮標本の粘度を小さくし、同時に核酸ハイブリダイゼーション検定に於けるハイブリダイゼーションの標的として使用されるはずの核酸性RNA分子の分解が妨げられる。当然ながら、付加DNAseは、DNAハイブリダイゼーションプローブ（あるいはRNAプローブ）を用いることもできる）を標本に加える前には、不活性でなければならぬであろう。

選択細菌種は、凍結標本中の白血球細胞を溶解した後に従定することができる。好ましくは、この検定工程は、既述の溶解および消化工程に従い行う。選択細菌種を培養する場合には、濃縮標本を処理して、望ましくない細菌種を殺し、同時に選択細菌種を保持する

ように、消化剤の選択に当たっては、DNAseまたは他の後期溶解性消化剤を不活化するその後の加工工程に於いて都合の良いと思われる程度までの消化剤を選択するという事実を留意すべきである。ウシ肝臓由来のDNAse Iはこれらの要件を満足するものである。

注目の細菌種（このようなものが標本中に存在していれば）を付随したペレット化した無傷の白血球細胞を含有する凍結標本の溶解は、上清をデカントした後に行う。溶解剤の適量、即ちデオキシコール酸ナトリウム（水中、16%）の場合には出発凍結試料1xμlに対して約2滴（約60μl）を白血球細胞ペレットに加える。次いで、このペレットを、旋回ミキサーを使用して懸濁し、室温で5分間インキュベートする。

この溶解工程の後、DNAseなどのDNA消化剤を凍結標本に加える。ウシ肝臓DNAse I 7446ナノモット/μlを含有する溶液の場合、1滴（約50μl）には、溶解工程に於いて白血球細胞から遊離されたDNAを消化し、適当に不活化するのに十分な酵素が含有されている。この消化混合物を約20-25℃で約5分間

に十分な細胞無傷の状態を保持できない場合もある。このような場合には、本発明の技術は、ある種の修飾工程を行うことで依然として好適に実施することができる。

第1に、広い範囲の細菌種に適用できる一般的な技術である、細胞を付随した白血球細胞の溶解方法によって、決定されるべき選択細菌種を培養試料から濃縮する。この技術は、例えば、以後の加工工程で通過するからしめない細胞の完全性の問題はあっても、最初の濃縮工程として利用することができる。

核酸ハイブリダイゼーション検定の場合は、決定されるべき細菌種の核酸成分を、核酸を分解し得るDNAseまたはRNAseなどの物質に暴露することから避けることが望ましい。注目の細菌種を、白血球細胞の溶解に際して細胞無傷の状態に保持できない場合には、溶解した凍結標本中に存在しているかもしれないDNAseまたはRNAseを同時に不活化する溶解工程を直接行うことが望ましいであろう。例えば、ペレット化した白血球細胞を、DNAseおよびRNAseを阻害または寛性するイデシル硫酸ナトリウムで溶解し、次い

特表平1-503006 (10)

インキュベートすれば、以後の検定工程にとって十分に不活化された濃縮標本が得られる。溶解し、消化したばかりのこの濃縮標本を直ぐに選択された細菌種の存在に際して試験しない場合、例えばマイコプラズマのような場合には、約2-8℃で24時間保存することができる場合がある。

マイコプラズマ属の細菌は、細胞壁に高濃度のろう糖質物質（very lipid materials）を有していることが一因となって、自身の細胞の完全性が破壊されることに対しては比較的低抵抗力がある。このような細菌は、核酸ハイブリダイゼーション検定を目的としたデオキシコール酸ナトリウムおよびイデシル硫酸ナトリウムなどの溶解剤に対して細胞無傷の状態を保持している。遠心分離で濃縮された標本中の白血球細胞を溶解することである溶解剤に対して決定である他の細菌種も、上述の濃縮、溶解および消化工程にしたがって処理することができる。既述したように、凝縮汁液性の病原体はこのカテゴリー内に包含することができる。しかし、絶方、決定に際して選択された細菌種が、例えば白血球細胞の溶解工程の間

で遊離された核酸（主としてDNA）を研製でき、溶解した濃縮標本の粘度を小さくすることのできる音波処理工程を行えばよい。例法としては、一般にDNAseまたはRNAseを不活化しないデオキシコール酸ナトリウムなどの溶解剤を、RNAse阻害物質および付加DNAseと共に使用すればよい。この組合わせによれば、溶解白血球細胞および細菌から遊離されたDNAが消化され、従って濃縮標本の粘度を小さくし、同時に核酸ハイブリダイゼーション検定に於けるハイブリダイゼーションの標的として使用されるはずの核酸性RNA分子の分解が妨げられる。当然ながら、付加DNAseは、DNAハイブリダイゼーションプローブ（あるいはRNAプローブ）を侵襲することもある）を標本に加える前には、不活性でなければならぬであろう。

選択細菌種は、濃縮標本中の白血球細胞を溶解した後に検定することができる。好ましくは、この検定工程は、前述の溶解および消化工程に従い行う。選択細菌種を培養する場合には、濃縮標本を処理して、望ましくない細菌種を殺し、同時に選択細菌種を保持する

ようにする。比較的頑固なマイコバクテリウムの場合、この工程は、凍結標本（既に溶解および消化を行った標本）を希釈水酸化ナトリウムで処理すれば行うことができる。別途とすれば、ドデシル硫酸ナトリウムによる処理はマイコバクテリウム以外の細菌種を多く選択的に殺すらしい。選択的に選択細菌種を増殖するもう1つの方法は、目的の細菌種以外の微生物のすべてまたはその殆どの増殖を阻害する培養培地を使用することである。

選択細菌種の存在に關しての好ましい検定方法は、核酸ハイブリダイゼーション検定法に關連する。上述のように調製した、溶解し、消化した凍結標本であって、例えば細菌組織のマイコバクテリウムを含有する標本の定量的量の試料（例えば、100 μ l）を、細胞を溶解するために窒素に移す。細胞の溶解は、核酸ハイブリダイゼーションの操作を妨害し得る標本中のDNAaseおよびRNAaseを不活化する所に行うべきでない。ドデシル硫酸ナトリウムは、このような不活化剤として使用することができ、さらにこれはクンバク質および他の細胞成分の可溶化に役立つ。ガラスビーズ(glass beads)

実験例1

デオキシコロール酸ナトリウムを使用した白血球細胞の溶解；DNAase I を使用した粘性の溶解

凍結（0.25 μ l）を、ジチオトレイトールのリン酸緩衝液（1 M ジチオトレイトール、0.1 M リン酸ナトリウム（pH=7.5））溶液を添加しキナーを添加して混合した。30%デオキシコロール酸(deoxycholic)酸液（0.5 μ l）を加えると、これにより、標本は、白血球からDNAが遊離し、非常に、非常に粘性の高いものになった。デオキシリボヌクレアーゼ（5 μ g/ μ l）10 μ lを加え、標本を再び混合した。室温で数分間放置すると粘性が消失した。

この実験は、DNAが凍結標本に於ける粘性の原因となり得、またDNAase I がDNAを分解し、5%デオキシコロール酸ナトリウムの存在下で粘性を減少させるよう作用し得ることを示していた。さらに、この実験は、ある種の凍結標本が、粘性の原因であるDNAを部分的に分解する程に十分に高いレベルの内在性DNAase

発表号1-503006 (11)

およびドデシル硫酸ナトリウムなどの増殖試料を含有するガラス製溶解用チューブ(glass lysing tube)であって、その使用が係属中の米国特許出願第841,880号（1986年8月20日出願）に開示されているチューブは、この細菌の溶解工程には特に適している。この溶解用チューブに栓をし、水浴音波処理器【水浴ソニケーター】（50-70℃）中に置き、約15分間音波処理する。【任意のエネルギー転移を促進するため、水浴音波処理器の水を替えし（は、この操作の前に約15分間音波処理することによって脱気しておく）。

音波処理の後、溶解した細胞組織試料を、係属中の米国特許出願第816,711号（1986年1月7日出願）に開示されている核酸ハイブリダイゼーション検定にかけることができる。プローブ反応混合物には、ハイブリダイゼーション反応の速度を速め、残ったDNAaseの活性を阻害するジソブチルスルホスクシネートなどの洗淨剤の試料を含有させることができる。

実験例

を有していないことを示していた。

実験例2

デオキシコロール酸ナトリウムを使用した白血球細胞の溶解；内在性DNAaseの活性による粘性の溶解

凍結細胞で100×の塗抹標本1個当たり50個以上の白血球を含有する化膿性膿液1.5 μ lを、0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH=7.5）中、0.001 M ジチオトレイトール0.5 μ lと混合した。この試料を旋回キナーで数秒間混合し、室温に15分間放置した。この時間は液状化してしまう時間であった。50 μ l部分量を試験管に移し、10%デオキシコロール酸ナトリウムの2倍量と共に混合して粘性を急速に増強させた。次いで、この粘性は10-20秒経過すると消失した。

この実験は、低濃度のジチオトレイトールに露置させても、使用した条件下では白血球細胞を溶解しないか、あるいは凍結標本中に白血球細胞のDNAを遊離させないことを示した。デオキシコロール酸ナトリウムを追加すると、細胞は溶解され、溶液に粘性を与え

る細胞自身のDNAが遊離された。この活性は、この標本中で自然に減少したが、これは内在性DNAseの作用に由来するものであった。

実施例3

ジチオトレイトールおよびDNAseを使用してマイクロ培養液標本の液状化

血液の型および培養液の型のすべてを包含した型である12種の培養標本を、1M ジチオトレイトール、0.1M トリス-HCl (pH = 8.0) および0.25% DNAse I を含有する可溶性剤の等量と混合した。

すべての培養液は急速にかつ完全に液状化した。

実施例4

マグネシウムを加えてジチオトレイトールおよびDNAse I を用いた培養標本の液状化

保存していた培養試料（抗酸性培養液が陽性の3つの培養標本から得た）を、1M ジチオトレイトール、0.1M トリス-HCl (pH = 8.0) および0.25% DNAse I を含有する可溶性剤の等量と混合した。

ハイブリダイゼーションの動力学は、この細胞関連のフラグメンテーション中、0.5ml 培養液あたり少なくとも 1.6×10^4 個のマイコバクテリウムがあることを示した。上清のフラグメンテーションにはマイコバクテリウムが検出されず、検出されずに存在し得る最大の数は1ml 当たり約 2×10^4 個と計算された。マイコバクテリウムのRNAを上清フラグメンテーションに加えた後、ハイブリダイゼーション検定を行うことで、上清に関するネガティブな結果は、ハイブリダイゼーション検定を阻害する成分に基づくものではないことがわかった。これにより、マイコバクテリウムは比較的低い遠心分離の力で液状化培養標本から効率的にペレット化できると結論付けられる。

実施例5

4つの抗酸性陽性の培養標本を使用した実施例5のプロトコールによる検定報告

実施例5に於ける実験プロトコールを、さらに4つの培養標本に関して報告した。その結果を以下に示す。

標本1: 細胞ペレットは全量約 6×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。上清は最大で全量 3×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。

特表平1-503006 (12)
H = 8.0) の等量と共に混合した。0.1M MgCl₂ 50μl を DNAse I (20mg/ml : 1400ユニット/mg : 0.15M NaCl, 50mM CaCl₂) 10μl と共に加えた。

この培養標本は十分に液状化された。MgCl₂ を加えると、二価カチオン (DNAseが活性を系するために必要) を特に加えない従来からの処理試料と比較すると、液状化反応は加速されたようであった。

実施例5

白血球凝集の遠心分離によるマイコバクテリウムの回収効果

培養液（抗酸性陽性）1.5ml を等量の0.1M トリス-HCl (pH = 8.0)、1M ジチオトレイトールと混合させることによって混合した。液状化培養液を臨床用遠心分離 (clinical centrifuge) によって3分間遠心分離にかけた。上清を確保し、放置した。得られたペレットを0.15M NaCl 5ml で1回洗浄した。100% 液状化DNAプロンプを用いたハイブリダイゼーションによって、この試料をマイコバクテリウムのrRNAに関して検定した。

を含有していた。上清は最大で全量 3×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。

標本2: 細胞ペレットは全量約 4×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。上清は最大で全量 1×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。

標本3: 細胞ペレットは全量約 1×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。上清は最大で全量 1×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。

標本4: 細胞ペレットは全量約 8×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。上清は最大で全量 2×10^4 個のマイコバクテリウムを含有していた。

これらの実験により、マイコバクテリウムを培養試料の白血球凝集フラグメンテーションに回収できることを確認した。

附表平1-503006(13)

PCT/US68/00919

Attachment to PCT/ISA/210
Part I. Classification of Subject Matter

INT CL. C120 1/04, 10, 24, 44, 68,; C12R 1/32; G01N
1/00, 18; G01N 33/48, 560.

U.S. CL. 435/268, 270, 810, 863
436/63, 179, 177, 501, 825

INTERNATIONAL PATENT CLASSIFICATION

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

U.S. 435/268, 270, 810, 863; 436/63, 179, 177, 501, 825

APR SEARCH: (MICROLYSIS OF MICROBIAL OR INDIUS OR MUCOSAL or NUCLEOTIC, LYTIC or LYTIC OF LYSING OR LIQUID?) and

U.S. CL. 435/268, 270, 810, 863; 436/63, 179, 177, 501, 825

Y	US, A. 3,802,779 (DYE et al) 24 March 1974. See column 2, lines 31-35.	1-44, 48 & 50
Y	US, A. 4,052,363 (DORN) 11 October 1977. See column 2, lines 8-12	1-44, 14 & 16
Y	US, A. 4,358,535 (FALKOW et al) 9 November 1982. See column 3, lines 1-5 and column 4, lines 19-23.	1-44
Y	US, A. 4,409,118 (KALTS) 11 October 1983. See column 1, lines 47-49 and Example 7.	1-44

24 JUNE 1988

02 AUG 1988

DAVID A. SANDERS

Attachment to PCT/ISA/210
Part II. Documentation Searched other than Minimum
Documentation in the Extent that such Documents are
included in the Fields Search.

(DITHIOTREITOL OR DTF)

and

(DMASS OR DNAGE OR DEOKYRIBOW/CLASE)

INTERNATIONAL PATENT CLASSIFICATION

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

U.S. 435/268, 270, 810, 863; 436/63, 179, 177, 501, 825

APR SEARCH: (MICROLYSIS OF MICROBIAL OR INDIUS OR MUCOSAL or NUCLEOTIC, LYTIC or LYTIC OF LYSING OR LIQUID?) and

U.S. CL. 435/268, 270, 810, 863; 436/63, 179, 177, 501, 825

Y	US, A. 4,403,920 (GILLESPIE et al) 20 November 1984. See column 3, lines 1-22 and column 4, line 1	1-44, 48 & 50
Y	US, A. 4,508,822 (MARSHALL et al) 3 April 1985. See column 1, line 51 - column 2, line 57; column 3, lines 31-33; and Example 3.	1-44, 48 & 50

24 JUNE 1988

02 AUG 1988

DAVID A. SANDERS

转表平1-503006 (14)

Author	Citation of Document	Indexing
Y	US. A. 4,627,251 (RADJEL et al) 11 November 1966. See column 4, lines 62-69.	26-50
Y.2	US. A. 4,666,234 (JACUSLAVSKI et al) 25 August 1967. See column 7, line 57	2-2
Y	EP. A. 0,149,169 (HAMEOUR et al) 24 July 1986. See page 8, lines 5-19 and Example 5.	22-26. 23-27. 24-28
Y	EP. A. 0,166,166 (RICHARDS) 3 January 1986. See page 2, line 12; page 6, line 11.	23-26. 22-27 28-29 29-30
Y	SIDNEY P. CALOWICH et al (Eds.) METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 7, published 1962, by Academic Press (New York). See A.P. Studies, "Preparation and solubilization of particles; bacterial", pp. 51-61, especially p. 58.	27-30 6-30
3	ELI Lachmetz (Ed.) MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Fourth Edition, published 1965, by American Society of Microbiology, (Washington). See Lachmetz et al "Hydrocarbons" pp. 210-240, especially pp. 227-229.	
202	AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE, vol. 47, issued 1946 (New York) Lieberman, "Measurement of sputum viscosity in a copo- late viscometer". pp. 662-672. See especially page 662, column 2 page 663, column 1 and page 663 column 2 page 664, column 1	2-2 23-27

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正の掲載

昭和63年特許願第503551号（特表平 1-503096号、平成 1年10月12日発行公表特許公報）については特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

Int.Cl.	識別記号	庁内整理番号
G01N 33/48		L-7055-2J
C12Q 1/04		6897-4B
	1/44	6807-4B
	1/58	A-8453-4B
G01N 1/28		J-7619-2J
		G01N 1/28

7. 補正の内容

(イ) 明細書

- (1) 10頁、8行「細胞培養」を「細胞培養(細胞として無菌操作)」に訂正する。
- (2) 12頁、4行「存在」を「存在(有罪)」に訂正する。
- (3) 23頁、7行「細胞培養」を「細胞培養」に訂正する。
- (4) 23頁、8行「細胞培養」を「細胞培養(細胞として無菌操作)」に訂正する。
- (5) 27頁、14行「細胞培養」を「細胞培養」に訂正する。
- (ロ) 請求の範囲
別紙の通り

以上

平成 7. 8. 18 発行
手続補正書

平成 6年12月20日

特許庁長官

1. 事件の名称

昭和63年特許願第503551号

2. 発明の名称

細胞培養用培地の調製方法

3. 補正をする者

発明者の代表者 特許出願人

名称 ジェン・ゾロップ インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒540
大阪府大阪市中央区本町1丁目3番7号 INPTEL
青山事務所
電話 (06) 549-1241
FAX (06) 549-0161

氏名 代理人 (0214) 青山 三

5. 補正中の目的

特許 (公衆の利益と関係)

6. 補正の理由

明細書および請求の範囲

(別紙)

請求の範囲

1. ムコイド分泌細胞または、分泌を有する他の生物学的標本を活性化するための方法であって、
(a) 該標本をジスルフィド結合還元剤と接触させて該標本のタンパク質分子内に潜するジスルフィド結合を開裂させる工程、および
(b) 該標本をDNA還元剤と接触させて該標本のDNA分子内に潜するホスホジエステル結合を開裂させる工程
からなることを特徴とする方法。
2. ジスルフィド結合還元剤がチオオレイトールである請求項1に記載の方法。
3. DNA還元剤がデオキシリボスクレアゼIである請求項1に記載の方法。
4. ムコイド分泌細胞標本をチオオレイトールおよびデオキシリボスクレアゼIと接触させる工程を包含する該ムコイド分泌細胞標本を活性化する方法。
5. ムコイド分泌細胞標本を該標本である請求項4に記載の方法。
6. 培養標本を、ジスルフィド結合還元剤およびデオキシリボスクレアゼIのなる混合液と接触させる請求項4に記載の方法。
7. 選択された生物学的標本に関してムコイド分泌細胞または、分泌を有する他の生物学的標本を決定するための、該生物標本を決定する前に該標本を活性化する方法を有しているキットであって、該標本を活性化するための手段として請求項1に記載の方法に基く当該キット。
8. 選択された生物学的標本に関してムコイド分泌細胞標本を決定するための、該生物標本を決定する前に該標本を活性化する方法を有しているキットであって、該標本を活性化するための手段として請求項1に記載の方法に基く当該キット。
9. 選択された細胞標本の状態に関して培養標本を決定するための、該培養標本を決定する前に該標本を活性化する方法を有しているキットであって、該標本

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.